

PGT/JP00/06111

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

0709.00

JP00/6111

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月13日

出願番号
Application Number:

REC'D 27 OCT 2000
WIPO PCT

平成11年特許願第259579号

出願人
Applicant(s):

松下電器産業株式会社

ESU

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特2000-3083211

【書類名】 特許願

【整理番号】 2030110018

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/30

【発明の名称】 脂質修飾酵素の製造方法およびバイオセンサ

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式
 会社内

 【氏名】 辻 里子

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式
 会社内

 【氏名】 吉岡 俊彦

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式
 会社内

 【氏名】 南海 史朗

【特許出願人】

 【識別番号】 000005821

 【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

 【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100072431

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 石井 和郎

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 066936

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9905716

【プルーフの要否】 要

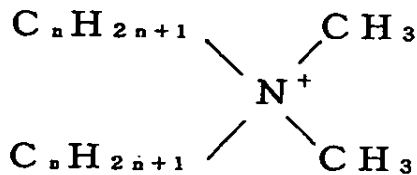
【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂質修飾酵素の製造方法およびバイオセンサ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式で表される脂質を分散した分散液中に酵素を溶解させる工程、酵素を溶解した脂質分散液を冷却し、脂質と酵素の複合体を析出させる工程、および析出した沈殿物を凍結乾燥によって脂質修飾酵素の粉体を得る工程を有することを特徴とする脂質修飾酵素の製造方法。

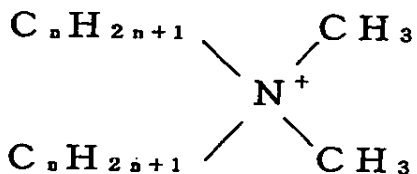
【化 1】



(式中 n は 1 4 ~ 1 8 の整数である。)

【請求項 2】 電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上またはその近傍に形成された反応層を具備し、その反応層が、酵素と下記式で表される脂質とを主体とする脂質修飾酵素を含む層および電子伝達体を含む層からなることを特徴とするバイオセンサ。

【化 2】



(式中 n は 1 4 ~ 1 8 の整数である。)

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液、尿等の生体試料、食品工業における原料や製品、さらには果

汁等の試料中に含まれる基質（特定成分）を高精度で、迅速かつ容易に定量できるバイオセンサに関する。

【0002】

【従来の技術】

生体試料および食品中の特定成分（基質）を、試料液の希釈および攪拌などを行なうことなく、簡易に定量し得るバイオセンサが提案されている。その一例として、特開平3-202764号公報には、絶縁性基板上にスクリーン印刷などの方法によって電極系を形成し、この電極系上に酸化還元酵素および電子伝達体（電子受容体）を含有する反応層を形成したバイオセンサが開示されている。

このバイオセンサは、以下のようにして、試料中の基質濃度を定量する。

まず、試料液をバイオセンサの反応層上に滴下することにより、反応層が溶解し、試料液中の基質と反応層の酸化還元酵素との間で酵素反応が進行する。この酵素反応に伴い、電子伝達体が還元される。一定時間後、センサの電極に電圧を印加して、この還元された電子伝達体を電気化学的に酸化し、このとき得られる酸化電流値から試料液中の基質濃度を定量することができる。

【0003】

また、脂質修飾酵素を用いたバイオセンサとして特開平7-110313号公報が開示されている。酵素は脂質修飾することによって水に不溶、有機溶媒に可溶となり、水に可溶な電子伝達体とは分離した状態で反応層を形成することができる。このことにより、迅速かつ高い保存信頼性を持ったセンサを提供することができる。

【0004】

脂質修飾酵素を用いない従来の構成のバイオセンサでは、酵素と電子伝達体とが同一反応層中に存在するため、試料液が供給されると速やかに反応が開始されるという利点があった。しかしながら、酵素は電子伝達体などの化合物との混在状態で長期間保存されると、その活性が低下し、センサの応答特性が劣化するという問題点があった。さらに、基質を含まない試料液に対する酸化電流値（ブランク値）が得られるという問題点もあった。そこで、酵素と電子伝達体を別々の層へ分離させる構成が考えられるが、酵素及び電子伝達体は何れも水溶性である

ため、完全な分離状態にすることが困難であった。

さらに、酵素を脂質修飾する場合は、高い応答性を示す脂質修飾酵素を高い収率で得ることが非常に困難であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来構成のバイオセンサの利点を活かしつつ、上記のような問題点を解決するもので、回収率が高く、高い応答性を持った脂質修飾酵素の製造方法を提供することを目的とする。

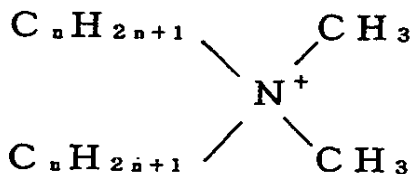
また、本発明は、その脂質修飾酵素を用いて、保存信頼性が高く、しかもブランク値が低く、基質を高精度で定量できるバイオセンサを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するため、本発明の脂質修飾酵素の製造方法は、下記の式で表されるカチオン性の脂質を分散させた脂質分散液中に酵素を溶解させる工程、酵素を溶解した脂質分散液を冷却し、脂質と酵素の複合体を析出させる工程、および析出した沈殿物を凍結乾燥によって脂質修飾酵素の粉体を得る工程を有することを特徴とする。

【化3】



(式中 n は 14 ～ 18 の整数である。)

本発明のバイオセンサは、電気絶縁性の基板、前記基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および前記電極系上またはその近傍に形成された反応層を具備し、その反応層が、酵素と前記式で表される脂質とを主体とする脂質修飾酵素を含む層および電子伝達体を含む層からなる。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の脂質修飾酵素の製造方法について説明すると、まず超音波洗浄機などを用いて前記式で表される脂質を分散媒、好ましくは水に分散させ、脂質分散液を調製する。その液に酵素粉末を溶かし入れた後、冷却して脂質と酵素の複合体を析出させ沈殿物を得る。次いで、この沈殿物を分離し、水で洗浄して凍結乾燥し、粉末状の脂質修飾酵素を得る。

ここで、前記式において、 $n \leq 13$ のときは、脂質と酵素の複合体は析出しない。また、 $19 \leq n$ のときは、水に分散せず、脂質分散液の調製ができない。

【0008】

脂質で修飾された酵素は、有機溶媒に可溶で、水に不溶となる。そのため、バイオセンサに酵素の層を形成するには、有機溶媒に溶解した溶液を基板の電極上またはその近傍に滴下し、乾燥させる方法が簡便である。一方、水溶性の電子伝達体は、その水溶液を所定の場所に滴下し、乾燥して層を形成することができる。従って、このような方法により層を形成すると、脂質修飾酵素を含む層と電子伝達体を含む層をいずれの順序で設けても、各々の層に含まれる酵素および電子伝達体が互いの影響を受けることなく、均一な層を形成することが可能である。

【0009】

本発明によるバイオセンサの反応層は、前記のとおり電子伝達体を含有する。電子伝達体としては、フェリシアンイオン、p-ベンゾキノンおよびその誘導体、フェナジンメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセンおよびその誘導体などが挙げられる。電子伝達体は、これらの1種または2種以上が用いられる。特に、フェリシアンイオンを用いることが好ましい。

【0010】

本発明によるバイオセンサの反応層には、上記酵素類や電子伝達体の他に、親水性高分子を含有させてもよい。反応層中に親水性高分子を添加することにより、基板または電極系表面からの反応層の剥離を防ぐことができる。さらに、反応層表面の割れを防ぐ効果も有しており、バイオセンサの信頼性を高めるのに効果的である。

このような親水性高分子としては、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、エチルヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルエチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリリジンなどのポリアミノ酸、ポリスチレンスルホン酸、ゼラチンおよびその誘導体、アクリル酸またはその塩の重合体、メタアクリル酸またはその塩の重合体、スターチおよびその誘導体、無水マレイン酸またはその塩の重合体などが挙げられる。特に、カルボキシメチルセルロースが好適に用いられる。

酸化電流の測定方法としては、測定極と対極のみの二極電極系方式と、参照極を加えた三電極方式があり、三電極方式の方がより正確な測定が可能である。

【0011】

【実施例】

以下に、具体的な実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明する。

図1は、本発明によるバイオセンサの反応層を取り除いた分解斜視図である。ポリエチレンテレフタレートからなる電気絶縁性の基板1上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード2および3を形成している。次いで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板1上に印刷して作用極4を形成している。この作用極4は、リード2と接触している。さらに、この基板1上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層6を形成している。絶縁層6は、作用極4の外周部を覆っており、これにより作用極4の露出部分の面積を一定に保っている。そして、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストをリード3と接触するように基板1上に印刷してリング状の対極5を形成している。

上記リードおよび電極の材料としては、銀やカーボン以外にも、白金、金、およびパラジウム等が用いられるが、使い捨てタイプのバイオセンサでは、銀ペーストによるリードおよびカーボンペーストによる電極が適当である。

【0012】

図2は、本発明によるバイオセンサの縦断面略図である。

図1のようにして電極系を形成した電気絶縁性の基板1上に、酵素類あるいは電子伝達体を含む第1の層7aを形成し、その上に酵素類を含む第2の層7bを

形成することにより反応層 7 を形成した。

このグルコースセンサは、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性基板 1、カバー 9、および基板 1 とカバー 9 の間にサンドイッチされるスペーサ 8 から組み立てられる。これらが図 1 の中の破線で示すような位置関係をもって接着されてグルコースセンサが構成される。

スペーサ 8 には、試料液供給路を形成するスリット 10 が形成され、また、絶縁性基板 1 には空気孔 11 が形成されている。基板 1 とカバー 9 を間にスペーサ 8 を挟んで積層し接着すると、基板 1 とカバー 9 の間のスリット 10 の部分に、試料液供給路となる空間部が形成される。この空間部は、始端部となるスリット 10 の解放端部が試料液供給口となり、終端部は空気孔 11 に連通する。

【0013】

ここで、カバー 9 とスペーサ 8 の組み合わせでカバー部材を構成しているが、スペーサ 8 のスリット 10 に相当する溝を設けた 1 つの部材で構成することもできる。このように絶縁性の基板に、前記基板との間に試料液供給路を形成するカバー部材を組み合わせで構成したバイオセンサでは、反応層は、必ずしも電極系上に形成する必要はない。反応層は、試料液が試料液供給路を毛管現象により電極系上に達するまでに、試料液に溶解するよう試料液供給路に露出する部分に形成されていればよい。

【0014】

＜実施例 1＞

図 1 の基板 1 の電極系上に、フェリシアン化カリウムの水溶液を滴下し、乾燥させて第 1 の層 7 a を形成した。この第 1 の層 7 a 内に含まれるフェリシアン化カリウムの量は、反応層 1 平方センチメートル当たり 1 mg であった。

次に、第 1 の層 7 a 上に、以下のようにして、脂質で修飾した酵素の層を形成した。

まず、脂質修飾酵素の抽出方法を説明する。(化 3) において $n = 16$ の脂質 100 mg と脱イオン水 100 ml を混合し、超音波洗浄機を用いて脂質を脱イオン水に分散させ、脂質濃度 1 mg/ml の脂質分散液を作製した。この脂質分散液を溶媒とし、グルコースオキシダーゼ (EC 1. 1. 3. 4 : 以下 GOD と

略す)を 10 mg/ml 濃度に溶解させた。こうして脂質分散液に酵素を溶解した後、氷浴中において2時間冷却し、その後さらに冷蔵庫にて24時間冷却することにより、酵素と脂質の複合体を析出、沈殿させた。この沈殿物を残し、上澄み液をピペットにて取り除き、脱イオン水を加えて攪拌し、洗浄を行った。再び冷蔵庫内で冷却し、水に不溶となり析出した沈殿物を採取した。その後、予備冷却し凍結乾燥を行い、粉末状の脂質修飾酵素を得た。この際、脂質と酵素の混合割合は重量比で脂質1に対して酵素10であった。

【0015】

次に、前記脂質修飾酵素をトルエンに溶解し、その溶液を上記の第1の層7a上に滴下し、乾燥させて第2の層7bを形成した。この時、先に形成したフェリシアン化カリウムの層と脂質修飾酵素の層は完全に分離した状態で形成されている。この第2の層7b内に含まれるGODの量は、反応層1平方センチメートル当たり 100 mg であった。

グルコースを含む試料液が反応層7に供給されると、試料液内のグルコースは、GODにより酸化される。そして、これと同時に反応層中の電子伝達体が還元される。続いて、試料液を供給して1分後に、対極5に対して作用極4に $+0.5\text{ V}$ の電圧を印加して電子伝達体の還元体を酸化した。そして、5秒後の電流値を測定した。この電流値は、生成した電子伝達体の還元体の濃度、すなわち試料液中の基質濃度に比例するので、この電流値を測定することにより、試料液のグルコース濃度を求めることができる。

各種グルコース濃度の試料を用いて応答電流値を測定した結果、得られた応答電流値とグルコース濃度との間には、一定の相関性があり、良好な直線性を示した。(化3)において $n=14$ および18の脂質を用いた場合でも同様の結果が得られた。

【0016】

〈比較例1〉

(化3)において $n=12$ の脂質を用いて実施例1と同様に酵素の脂質修飾を行った。その結果、脂質と酵素を混合し冷却しても脂質-酵素複合体が得られず、脂質修飾酵素を作製することができなかった。

【0017】

〈比較例2〉

実施例1に示した酵素の脂質修飾効果を確認するために、脂質修飾をしていない酵素を用いたセンサの応答性とブランク値、そして保存信頼性を評価した。図1の基板1の電極系上に、フェリシアン化カリウムとGODの混合水溶液を滴下し、乾燥させて反応層7を形成した。この層7内に含まれるフェリシアン化カリウムの量は、反応層1平方センチメートル当たり1mgであり、GOD量は100mgであった。第1の層にフェリシアン化カリウムとGODの混合層を形成したため、第2の層は形成しなかった。

【0018】

次に実施例1と同様の方法でグルコース濃度の異なる試料液を用いてセンサの応答電流値を測定した。その結果、得られた応答電流値とグルコース濃度との間には、一定の相関性があり、良好な直線性を示した。この応答直線性は、実施例1で示したものとほぼ同じであった。しかしながら、ブランク値は $0.1\mu A$ であった。脂質修飾酵素を用いたセンサではブランク値が $0\mu A$ であったことから、脂質で修飾しない酵素ではブランク値が増加し、センサ応答が劣化することが分かった。脂質修飾酵素を用いたセンサと未修飾酵素を用いたセンサとの応答特性の比較を表1に示す。

【0019】

【表1】

	応答電流値 (μA)			
グルコース濃度 (mg/dl)	0	180	360	540
脂質修飾酵素	0.0	6.1	12.0	18.7
未修飾酵素	0.1	5.7	12.0	18.3

【0020】

また、実施例1の方法で作製したセンサと比較例2で示したセンサとを乾燥状態で $50^{\circ}C$ で1ヶ月間保存した結果、酵素を脂質修飾しないセンサの場合ブランク値が $0.2\mu A$ まで増加した。一方、脂質修飾酵素を用いたセンサの場合は0

． 0 5 μ A であり、ほとんど増加はなかった。これらは、酵素を脂質で修飾した効果に他ならない。

【 0 0 2 1 】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、血液、尿等の生体試料、食品工業における原料や製品などの試料中に含まれる基質（特定成分）を高精度で、迅速かつ容易に定量し得るバイオセンサを得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施例におけるバイオセンサの反応層を除いた分解斜視図である。

【図 2】

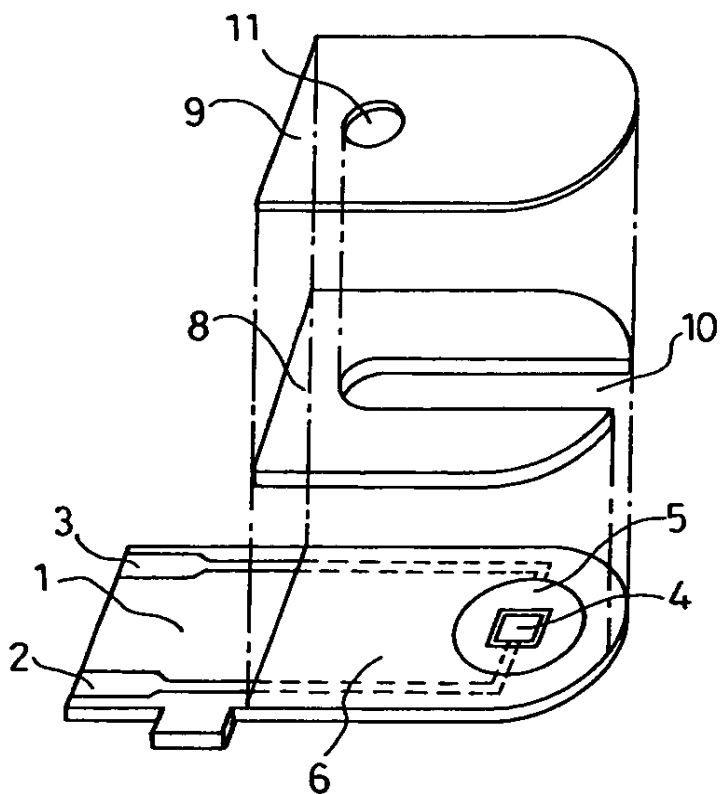
同バイオセンサの縦断面略図である。

【符号の説明】

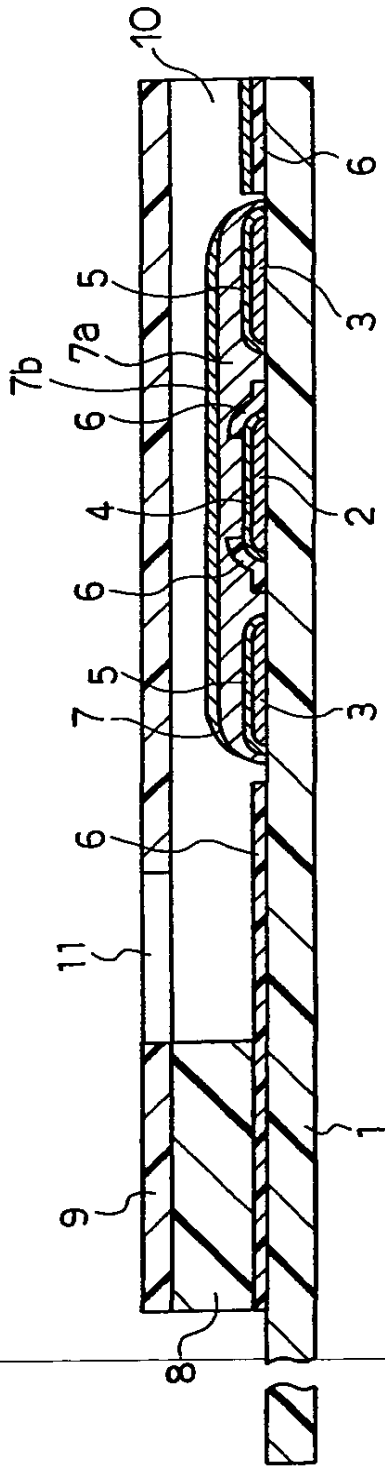
- 1 電気絶縁性の基板
- 2、3 リード
- 4 作用極
- 5 対極
- 6 絶縁層
- 7 反応層
- 7 a 第 1 の層
- 7 b 第 2 の層
- 8 スペース
- 9 カバー
- 1 0 スリット
- 1 1 空気孔

【書類名】 図面

【図 1】



【図2】



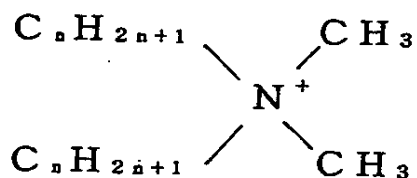
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高い保存信頼性を持ってグルコースなどの基質濃度を正確に測定できるバイオセンサを提供する。

【解決手段】 本発明の脂質修飾酵素の製造方法は、下記の式で表される脂質を分散させた脂質分散液中に酵素を溶解させる工程、酵素を溶解した脂質分散液を冷却し、脂質と酵素の複合体を析出させる工程、および析出した沈殿物を凍結乾燥によって脂質修飾酵素の粉体を得る工程を有する。バイオセンサは、電気絶縁性の基板上に形成された作用極と対極を有する電極系、および電極系上に形成された反応層を具備し、反応層が前記で得られる脂質修飾酵素を主たる成分とする層および電子伝達体を主たる成分とする層の2層からなる。

【化1】



(式中 n は 14 ~ 18 の整数である。)

【選択図】 図2

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第259579号
受付番号	59900891882
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成11年 9月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 9月13日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名 松下電器産業株式会社

